

Virus Respiratorio Sincicial: un desafío para la salud pública a nivel mundial

Claudia A. Rivera¹, Rodrigo A. Díaz¹, Pablo F. Céspedes¹, Alexis M. Kalergis^{1,2,3}

¹Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. ²INSERM U1064, Nantes, Francia. ³Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

El virus respiratorio sincicial humano (VRSh) es la principal causa de infecciones respiratorias agudas del tracto respiratorio bajo a nivel mundial, afectando principalmente a niños menores a cinco años y adultos mayores de 65 años. Mundialmente, el VRSh genera enormes gastos en salud pública debido al elevado costo de la hospitalización y tratamiento de las infecciones agudas. Actualmente, el único tratamiento específico disponible consiste en un anticuerpo humanizado neutralizante cuyo uso es bastante restringido y debido a su alto costo, no se encuentra asequible a la población general. Finalmente, a pesar de que han transcurrido más de 50 años de investigación tras la identificación del VRSh, actualmente no existen vacunas aprobadas que permitan la profilaxis y control epidemiológico de las infecciones causadas por este importante patógeno respiratorio.

EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL Y SU IMPACTO EN SALUD PÚBLICA

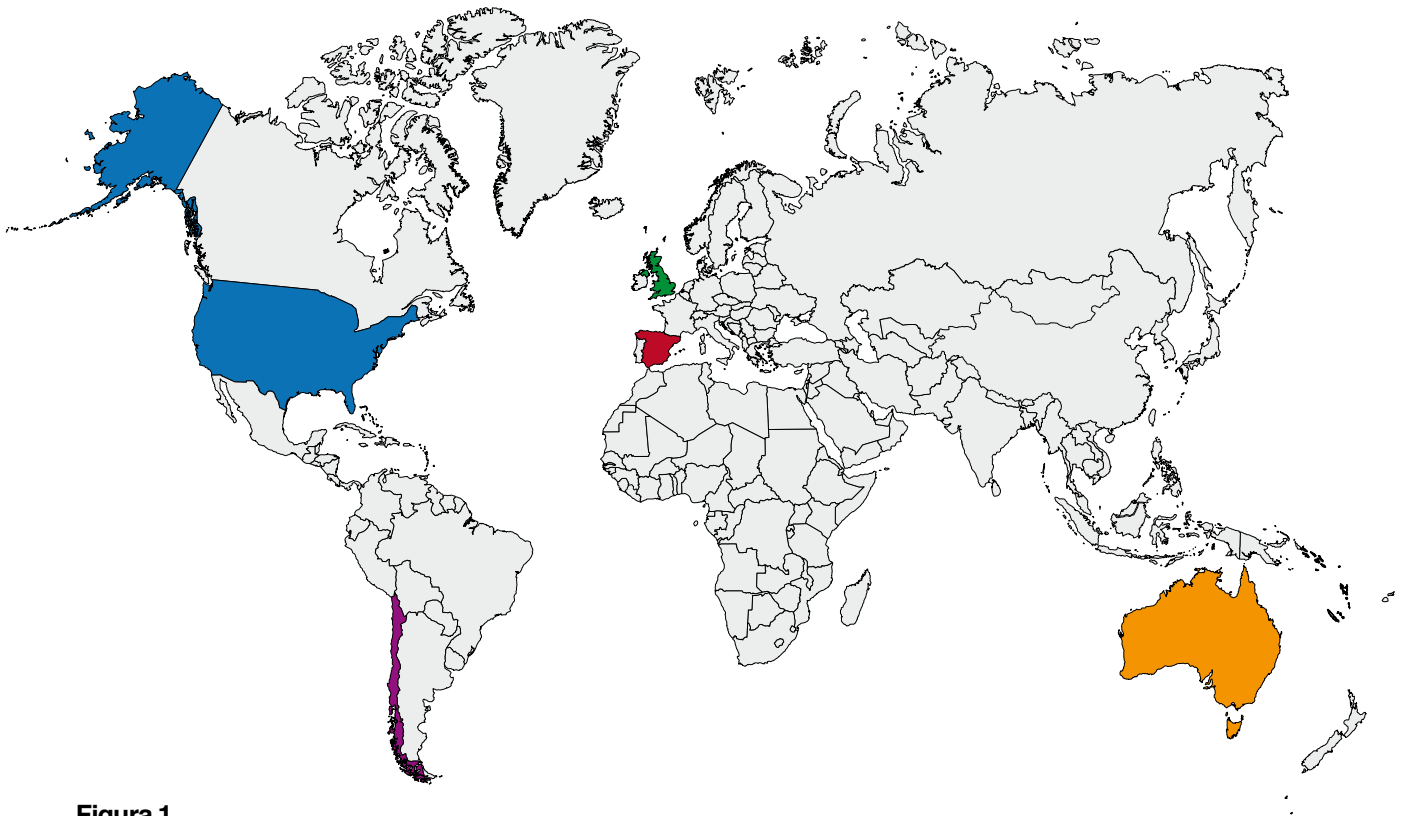
El virus respiratorio sincicial humano (VRSh) es el patógeno respiratorio causante de infecciones agudas del tracto respiratorio bajo más prevalente a nivel mundial, cuyo impacto se estima en aproximadamente 33,8 millones de infecciones en niños menores de cinco años y en la muerte de hasta 199.000 niños cada año alrededor del mundo¹. Aún más, se estima que el 70% de los niños menores de un año y cerca del 100% de los niños menores de dos años han sido infectados por este virus al menos en una oportunidad, presentando principalmente inflamación y obstrucción de las vías aéreas, lo que se refleja en síntomas como sibilancias, congestión nasal, rinoresaca, tos y, en los casos más severos, apnea y dificultades para respirar². En niños menores de dos años, individuos inmunocomprometidos y ancianos, el virus puede generar cuadros más graves como bronquiolitis y neumonía³. La población de adultos mayores de 65 años también se encuentra altamente afectada, por lo que informes de Estados Unidos y otros países han determinado que este patógeno respiratorio será cada vez más importante en países desarrollados⁴. Un estudio reciente en el Reino Unido estimó que las tasas de hospitalizaciones en este país atribuibles a VRSh en personas mayores de 65 años es 156/100.000 y

además que entre los casos de consultas de medicina general relacionadas a enfermedades respiratorias, hospitalizaciones y muertes debido a la infección causada por VRSh en adultos mayores de 18 años, un 36, 79 y 93 % respectivamente, ocurren en personas mayores de 65 años⁵. Finalmente, se ha estimado que desde el 2001 las consultas de medicina general relacionadas con enfermedades respiratorias, así como las hospitalizaciones y muertes debido a infecciones por VRSh fueron mayores que las causadas por influenza en esta misma población etaria⁵ (*Figura 1*). Por otro lado, estudios en Estados Unidos estiman que anualmente 11.000 adultos mayores mueren por enfermedades respiratorias agudas relacionadas a infecciones por VRSh en ese país, siendo los pacientes afec-

ACTUALMENTE, el único tratamiento específico disponible frente al virus respiratorio sincicial (VRS), la principal causa de infecciones respiratorias agudas a nivel mundial, consiste en un anticuerpo humanizado neutralizante cuyo uso es bastante restringido y, debido a su alto costo, no se encuentra asequible a la población general.

tados por enfermedades cardiopulmonares los que presentan una mayor prevalencia⁶. En la comunidad, las tasas anuales de infecciones por VRSh varían desde un 2 a 10% en adultos mayores⁶. Por otro lado, en ancianos que viven en residencias, la incidencia de infecciones por VRSh varía entre un 5 a 10%⁶ (*Figura 1*).

En niños hospitalizados por VRSh, entre 1 y 5 de un total de 10, requieren ventilación asistida, de los cuales más del 50% requiere terapia de oxígeno y cuya hospitalización se extiende por un promedio de 6 días⁷. En este mismo sentido, el promedio de días de hospitalización de niños menores de dos años debido a la infección con este virus varía desde cinco a ocho días en España, hasta 1,2 a 3,8 días en Estados Unidos y el Reino Unido⁷. Por otro lado, los costes asociados a la hospitalización por niño menor de cinco años en Estados Unidos alcanzan los 4.584 \$US mientras que los costes médicos de todos los casos de infección relacionada a VRSh en niños menores de cinco años se es- >>>

**Figura 1**

Impacto en salud pública del Virus Respiratorio Sincicial por país.

Estados Unidos

- 11,000 adultos mayores mueren por enfermedades respiratorias agudas relacionadas a infecciones por VRSh.
- 2-10% de adultos mayores que viven integrados en la sociedad y de un 5-10% de los adultos mayores que viven en residencias de ancianos se infectan por VRSh.
- 652 millones de dólares USA es el coste total de los gastos médicos asociados a infección por VRSh en niños entre 5 y un año de edad.
- 1,2-3,8 días de hospitalización promedio en niños menores de dos años por infecciones con VRSh.

ESPAÑA

- 156/100,000 adultos mayores de 65 años hospitalizados por causa de VRSh.
- 36% de las consultas de medicina general debido a infecciones por VRSh en adultos, corresponden a personas mayores de 65 años.
- 79% de las hospitalizaciones causadas por VRSh en adultos corresponden a personas mayores a 65 años.
- 93% de las muertes causadas por VRSh en adultos, corresponden a personas mayores de 65 años.
- Desde el 2001, en adultos mayores a 65 años las consultas de medicina general, hospitalizaciones y muertes debido a infecciones por VRSh fueron mayores que las causadas por influenza.
- 1-8 días de hospitalización es el promedio en niños menores de dos años por infecciones con VRSh.

Reino Unido

- 5-8 días de hospitalización promedio en niños menores de dos años por infecciones con VRSh.

AUSTRALIA

- Entre 24 a 50 millones dólares USA al año se estima el gasto total en salud relacionado con VRSh.
- VRSh es el virus detectado en mayor número de casos durante la década 1991-2000.
- Actualmente se reportan mensualmente más casos de VRSh que de influenza.

CHILE

- 6.758 casos de infecciones causadas por VRSh se detectaron durante 2014 en Chile, correspondiendo al agente viral más prevalente en este país.

estima en 652 \$US millones al año en este mismo país⁸ (Figura 1). En Australia, se estima que los gastos totales en salud relacionados a VRSh varían entre 24 a 50 millones anualmente \$US, correspondiendo al virus con mayor número de casos durante la década 1991-2000 en ese país, y aun actualmente se reportan mensualmente más casos de VRSh que los correspondientes a influenza⁹ (Figura 1). Por otro lado, en Chile se detectaron 6.758 casos de infecciones causadas por VRSh durante el 2014, correspondiendo al virus más prevalente en este país durante la época invernal (Fuente: <http://www.ispch.cl/listadoinformes-circulacionvirusrespiratorios2014>) (Figura 1).

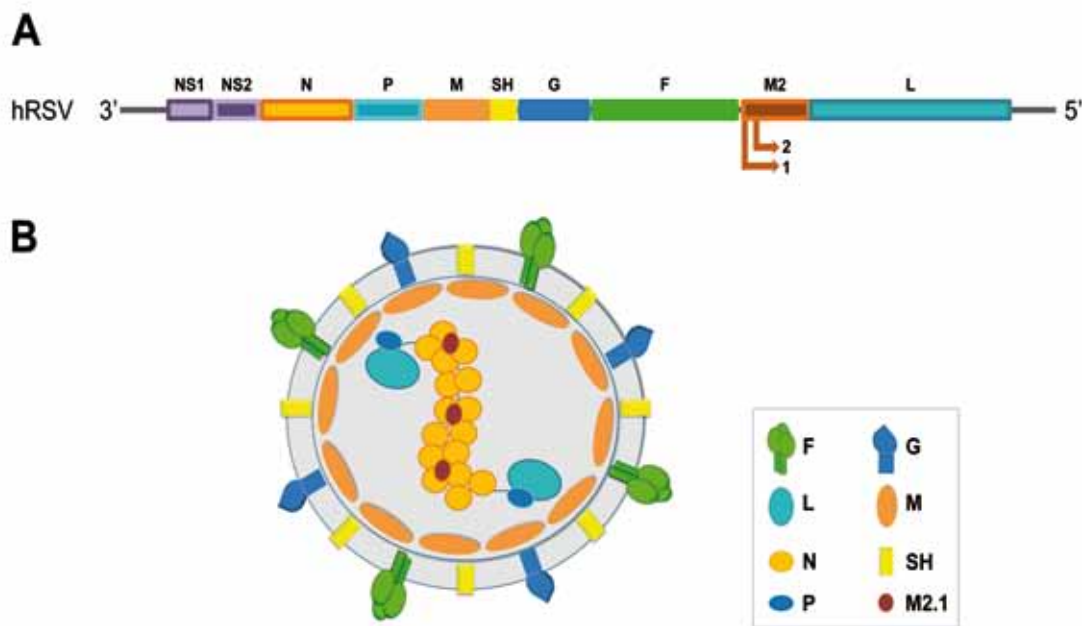


Figura 2

Genoma y estructura de una partícula del Virus Respiratorio Sincicial. **A** Genoma de VRSh de ARN de hebra simple de polaridad negativa que incluye 10 genes codificantes para 11 proteínas, incluyendo a las proteínas M2.1 y M2.2 que se originan a partir de la lectura alternativa del ARN mensajero. M2.2, NS1 y NS2 corresponden a proteínas no estructurales. **B** Estructura de la partícula viral que incluye 8 proteínas estructurales, 3 proteínas de superficie: la proteína de fusión (F), de anclaje (G) e hidrofóbica pequeña (SH), mientras que al interior de la partícula viral se encuentran la proteína de matriz (M), la nucleoproteína (N), la polimerasa de ARN ARN-dependiente (L), la proteína M2-1 y la fosfoproteína (P).

RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR EL VRSh

VRSh es un virus perteneciente a la familia Paramixoviridae, caracterizado por poseer una envoltura lipídica y encapsular un genoma de ARN con polaridad negativa que posee 10 genes codificantes para 11 proteínas³ (Figura 2). Dentro de las proteínas virales se encuentran tres glicoproteínas transmembrana: la proteína de fusión (F), la glicoproteína de anclaje (G) y la proteína hidrofóbica pequeña (SH)¹⁰. Además de las proteínas ya mencionadas, el virus posee otras cinco proteínas estructurales: la proteína de matriz (M) que participa del ensamblaje de la matriz viral, la nucleoproteína (N), la polimerasa de ARN ARN-dependiente (L), la proteína M2-1 y la fosfoproteína (P), que actúa como co-factor de L. La proteína M2-2 es traducida producto de la lectura alternativa del ARN mensajero de M2, luego de la terminación de la traducción de M2.1 y la reiniciación en un segundo marco de lectura abierta¹¹. M2-2 actúa como un factor de síntesis del RNA, regulando la transición entre transcripción y replicación viral^{13,12}. Finalmente, el VRSh posee dos proteínas no estructurales: NS1 y NS2, las que participan en la inhibición de la señalización y secreción de interferones de tipo I durante el proceso de infección del tejido epitelial (Figura 2).

La respuesta generada por el sistema inmune tras la infección por VRSh es débil en cuanto a la acción de células T y además provoca una gran secreción de moléculas pro inflamatorias (conocidas como citocinas), lo que finalmente causa una inflamación exacerbada de las vías aéreas¹³. Las células ciliadas

del epitelio pulmonar son el principal blanco del virus. En estas, la infección viral conduce a la síntesis y secreción de varias citocinas, incluyendo IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10 y TNF- α ^{14,15}. A las moléculas indicadas anteriormente se suma a la acción del sistema del complemento que incluye a moléculas como C3a y C5a, dos potentes anafilotoxinas¹⁶. Estas moléculas promueven la inflamación del tejido respiratorio, que involucra el reclutamiento de células polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos), los cuales potencian la patología generada por el virus, interfiriendo con su eliminación eficiente y aumentando el daño del parénquima pulmonar¹³ (Figura 3).

La respuesta inmune provocada por el VRSh se caracteriza por una respuesta mixta de tipo Th2 y Th17, siendo la primera la mejor caracterizada para este virus¹⁷. Por otro lado, este virus induce un aumento en la producción de anticuerpos de isotipo IgG1 e IgG3, los que exhiben propiedades neutralizantes limitadas frente a una reinfección y se asocian a un perfil Th2 de linfocitos T¹⁸ (Figura 3). Además la frecuencia de células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos contra VRSh se encuentra bastante disminuida en comparación a otros patógenos respiratorios como influenza¹⁹ y por otro lado, la frecuencia de mutaciones somáticas en genes de inmunoglobulinas en aquellas células B específicas en niños menores de tres meses de edad es mucho menor que en niños mayores, explicando en parte la alta tasa de infección en esta población²⁰. Además, la respuesta generada por >>>

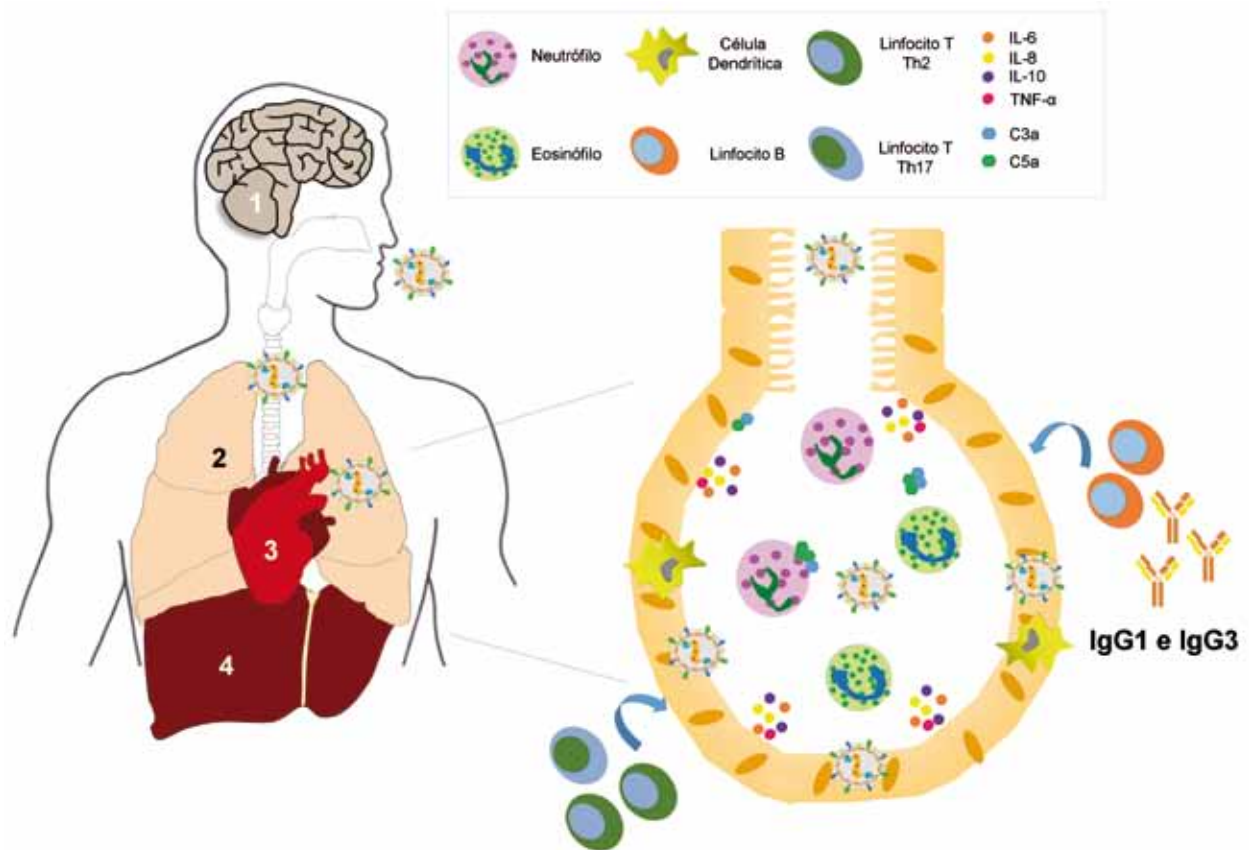


Figura 3.

Respuesta inmune en epitelio pulmonar y manifestaciones extrapulmonares causada por VRSh. 1 Este virus es capaz de infectar el sistema nervioso central, provocando alteraciones en el aprendizaje y memoria espacial y en cuadros severos, apnea, convulsiones, letargos, ataxia y encefalopatía. 2 VRSh genera principalmente síntomas como sibilancias, congestión nasal, rinorrea, tos, y en casos más severos apnea y dificultades para respirar. Este virus infecta principalmente las células epiteliales pulmonares, generando la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10 y TNF- α . Además se promueve el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos que potencian la patología generada por el virus, interfiriendo con su eliminación eficiente y aumentando el daño del parénquima pulmonar. A esto último también se suman el efecto de proteínas de complemento como C3a y C5a que promueven la inflamación del tejido pulmonar y la acción de linfocitos T CD4 de fenotipo Th2 y Th17. Linfocitos B secretadores de anticuerpos de isotipo IgG1 e IgG3 también se inducen por la infección con VRSh. Este virus también es capaz de provocar otras manifestaciones extrapulmonares como cardiopatías (3) y hepatitis (4).

el sistema inmune para contrarrestar la infección provocada por VRSh es deficiente y no genera memoria, por lo cual un mismo individuo puede reinfectarse en repetidas ocasiones a lo largo de su vida^{17,21}.

Otro tipo celular fundamental en la respuesta inmune adaptativa son las células dendríticas que, si bien no corresponden a células completamente permisivas para la infección por VRSh, igualmente son infectadas por el virus²². En este sentido, a pesar de que las células dendríticas presentan marcadores de maduración en su superficie en respuesta a VRSh como CD80, CD86 y MHC-II, estas no son capaces de activar de manera efectiva a las células T²³. Se ha demostrado que la pérdida de activación de las células T por parte de las células dendríticas no se debe a factores solubles secretados por esta última célula, sino más bien a la inhibición de la formación de la sinapsis inmunológica (SI) entre estas y células T vírgenes²³.

Debido a que la SI es una estructura molecular vital para la entrega de señales de activación a células T vírgenes, la supresión de su función reduce la diferenciación de estas últimas a células T de memoria²⁴. Recientemente, un estudio publicado por nuestro grupo ha demostrado que la nucleoproteína del VRSh se expresa en la superficie de las células dendríticas infectadas, impidiendo el adecuado ensamblaje de la SI²². Este último hallazgo sugiere que la inhibición de la SI mediada por VRSh podría ser un mecanismo central en la modulación negativa de la inmunidad adquirida del hospedero.

Recientemente se ha descrito que el VRSh es capaz de diseminarse desde las vías aéreas a otros tejidos y provocar manifestaciones extrapulmonares como cardiopatías y hepatitis, y además causar daños a nivel neurológico en pacientes con bronquiolitis más avanzada, generando cuadros de apnea, convulsiones, letargos, ataxia y encefalopatía (Figura 3)^{25,26}.

»» Además, estudios realizados en nuestro laboratorio en ratones BALB/cJ han mostrado que la infección por VRSh es capaz de migrar hacia el sistema nervioso central, lo que se refleja en la presencia de carga viral en el cerebro, y provocar alteraciones en el aprendizaje y memoria espacial en comparación con ratones no infectados (Figura 3)²⁷.

TERAPIAS ACTUALES CONTRA VRSH

La historia de la creación de terapias contra el virus respiratorio sincicial comienza unos pocos años luego de su identificación como agente etiológico de neumonía en infantes²⁸. De esta manera, en el año 1966 una vacuna basada en un virus inactivado por formalina (FI-VRSh) fue probada en ensayos clínicos causando la muerte de dos niños después de la infección natural por este patógeno²⁹. Esta inmunización causó una enfermedad pulmonar exacerbada caracterizada por una excesiva infiltración de eosinófilos en los niños, de los cuales un 80% requirió hospitalización²⁹. Tras más de cinco décadas de investigación, diversos estudios sugieren que la vacunación con FI-VRSh produce la acumulación en los pulmones de complejos inmunes compuestos por IgG y partículas o antígenos virales³⁰. Esta vacuna induce además la secreción de anticuerpos de baja avidéz y con pobre capacidad neutralizante³¹ y provoca la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1/Th2 desbalanceado que no es capaz de inducir la generación de células T CD8+ de memoria específicas contra el virus³².

Actualmente, el único tratamiento específico aprobado desde 1998 para tratar infecciones por VRSh, consiste en un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido hacia la proteína F del virus capaz de neutralizar la infección viral³³. Dicho anticuerpo, conocido como Palivizumab, es capaz de reducir en un 55% las hospitalizaciones en comparación al placebo³⁴. Sin embargo, recomendaciones recientes de Estados Unidos limitan el uso de este anticuerpo a niños prematuros nacidos antes de las 29 semanas de gestación. Antes de la trigésima segunda semana, solo se recomienda en infantes con enfermedades pulmonares crónicas y en niños menores de un año, solo en casos que presenten enfermedades cardíacas hemodinámicamente significativas. Además, no lo recomiendan en niños mayores a un año³⁵. Por otro lado, Ribavirina es otro tratamiento aprobado contra casos de alto riesgo de enfermedad asociada a VRSh, que actúa como un antiviral no específico inhibiendo la replicación viral. Este fármaco ha mostrado resultados favorables tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*; sin embargo, estudios de eficacia en humanos se encuentran inconclusos y presentan problemas de coste/eficacia y posibles efectos adversos que requieren ser analizados en profundidad^{36,37}. A pesar de una gran cantidad de esfuerzos realizados en este campo, aún no se dispone de una vacuna efectiva y asequible para la población en general. Numerosos intentos han mostrado resultados favorables en el desarrollo de prototipos de vacunas basadas en virus atenuados, como rA2cp248/404/1030ΔSH. Esta cepa, comprende cinco elementos genéticos independientes de atenuación y ha mostrado en adultos y niños seropositivos altos niveles de atenuación, así como un efecto protector consistente tras una

segunda dosis, como lo evidencia una replicación altamente restringida³⁸. MEDI-559, un virus atenuado derivado del anterior, mostró ser inmunogénico y atenuado; sin embargo niños inmunizados mostraron un aumento en las enfermedades respiratorias al tracto respiratorio bajo que requerían hospitalización, lo que generó cuestionamientos en torno a su seguridad^{39,40}.

Otras aproximaciones de vacunas contra VRSh se basan principalmente en las glicoproteínas de membrana F y G del virus, tal como un prototipo de vacuna basada en nanopartículas de F-VRSh. Este prototipo de vacuna es producida en células Sf9 de insecto mediante tecnología baculoviral recombinante y ha mostrado ser segura e inducir la generación de anticuerpos neutralizantes contra el virus, capaces de conferir protección en estudios preclínicos y de fase I. Actualmente se está evaluando en estudios de fase II en mujeres embarazadas y adultos mayores de 60 años para probar su efectividad^{41,42}. Otros estudios en modelos murinos incluyen la conjugación de versiones truncadas o solubles de la proteína F, conjugada a agonistas de receptores tipo Toll 4 y 3 respectivamente. Estas formulaciones han mostrado ser capaces de inducir respuestas celulares tipo Th1 y la secreción de anticuerpos neutralizantes contra VRSh⁴³⁻⁴⁵. Además, un virus de la influenza recombinante que incluye hemaglutininas fusionadas a un dominio conservado de la proteína G, demostró ser protector frente a un desafío con el virus e inducir la producción de anticuerpos específicos contra la proteína G-VRSh; sin embargo, este prototipo de vacuna no fue capaz de inducir respuestas de células T específicas contra el virus⁴⁶. Finalmente, también se han desarrollado múltiples estrategias basadas en partículas pseudovíricas (*Virus-like particles*) de las proteínas F y G del virus que también han mostrado eficiencia de protección contra la infección por este virus en modelos murinos⁴⁷⁻⁴⁹, y virosomas conjugados a ligandos de receptores tipo Toll 2 y 4, los que promovieron una respuesta humoral Th1/Th2 balanceada y una respuesta celular tipo Th1 capaz de contrarrestar la enfermedad causada por este patógeno respiratorio^{50,51}.

Tomando en consideración que VRSh induce un perfil Th2 tipo alérgico, se ha postulado ampliamente que la inducción de un perfil antiviral tipo Th1 podría contrarrestar el efecto causado por este virus. En este sentido, el desarrollo de un recombinante de *Mycobacterium bovis* cepa Bacillus Calmette-Guérin (BCG) que expresa la proteína N de VRS, ha mostrado resultados favorables contra el desafío de este virus^{27,52,53}. La inmunización con BCG-N ha mostrado inducir una respuesta celular eficiente basada en linfocitos T CD4 y CD8 productores de IFN- γ capaces de proteger frente a una infección viral, lo que se evidencia en una menor pérdida de peso, disminución en el infiltrado de neutrófilos en lavado bronqueoalveolares y en la carga viral en los pulmones^{52,53}. Esta vacuna recombinante también mostró ser capaz de disminuir significativamente la carga viral en cerebro y de prevenir las alteraciones cognitivas provocadas por una infección con este patógeno respiratorio²⁷, por lo que este prototipo de vacuna es capaz de otorgar protección completa contra infecciones con este virus, convirtiéndose en un candidato muy promisorio para proteger contra la patología causada por VRSh.

CONCLUSIONES FINALES

El avance en el entendimiento de VRSh, sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune y la patogénesis de la enfermedad pulmonar en modelos animales ha permitido el desarrollo de numerosos prototipos de vacunas y terapias para el tratamiento de las infecciones por VRSh, de los cuales sólo palivizumab se encuentra actualmente aprobado como terapia específica contra el virus. Además, el estudio epidemiológico de VRSh ha permitido exhibir el impacto socioeconómico y en salud pública que causa este virus, así como enfatizar en el hecho de que, a pesar de muchos años de estudio, aún no se dispone de un tratamiento efectivo de bajo coste y accesible a toda la comunidad que prevenga las infecciones por VRSh en niños y personas de la tercera edad. Dentro de las características biológicas de VRSh, los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que posee el virus han dificultado enormemente el desarrollo de una vacuna eficaz. La reciente identificación del efecto deletéreo de la nucleoproteína viral sobre la inhibición de la activación y expansión de células T CD4+, nos ha permitido sugerir que el desarrollo de una inmunidad celular específica contra esta proteína nos permitiría inducir una inmunidad celular protectora en niños recién nacidos. En este sentido, la promoción de una potente respuesta celular inducida por el prototipo de vacuna BCG-N en modelos animales, sugiere que la inmunización con esta recombinante podría constituir un importante candidato de vacuna que otorgue protección contra este patógeno. Finalmente, se necesita una alternativa a palivizumab que sea de bajo coste para mitigar el gran gasto económico y las complicaciones médicas que desarrollan los bebés, niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos infectados por VRSh, a fin de conferir protección no sólo frente a las manifestaciones pulmonares de la infección, sino también frente a complicaciones extrapulmonares y posibles secuelas neurológicas provocadas por este virus.

BIBLIOGRAFÍA

- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010 May 1;375(9725):1545-55.
- Eiland LS. Respiratory syncytial virus: diagnosis, treatment and prevention. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT: the official journal of PPAG* 2009 Apr;14(2):75-85.
- Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Research* 2011 Dec;162(1-2):80-99.
- Lee N, Lui GC, Wong KT, Li TC, Tse EC, Chan JY, et al. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2013 Oct;57(8):1069-77.
- Fleming DM, Taylor RJ, Lustig RL, Schuck-Paim C, et al. Modelling estimates of the burden of Respiratory Syncytial virus infection in adults and the elderly in the United Kingdom. *BMC infectious diseases* 2015;15:443.
- Branche AR, Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in older adults: an under-recognized problem. *Drugs & Aging* 2015 Apr;32(4):261-9.
- Diez-Domingo J, Perez-Yarza EG, Melero JA, Sanchez-Luna M, Aguilar MD, Blasco AJ, et al. Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. *BMC Infect Dis* 2014;14:544.
- Paramore LC, Ciuryla V, Ciesla G, Liu L. Economic impact of respiratory syncytial virus-related illness in the US: an analysis of national databases. *Pharmacoeconomics* 2004;22(5):275-84.
- Ranmuthugala G, Brown L, Lidbury BA. Respiratory syncytial virus -the unrecognised cause of health and economic burden among young children in Australia. *Communicable diseases intelligence quarterly report* 2011 Jun;35(2):177-84.
- Batonick M, Wertz GW. Requirements for human respiratory syncytial virus glycoproteins in assembly and egress from infected cells. *Adv in Virol* 2011 May 16;2011.
- Ahmadian G, Randhawa JS, Easton AJ. Expression of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. *The EMBO Journal* 2000 Jun 1;19(11):2681-9.
- Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Sep 28;96(20):11259-64.
- Lotz MT, Peebles RS, Jr. Mechanisms of respiratory syncytial virus modulation of airway immune responses. *Current allergy and asthma reports* 2012 Oct;12(5):380-7.
- Lay MK, Bueno SM, Galvez N, et al. New insights on the viral and host factors contributing to the airway pathogenesis caused by the respiratory syncytial virus. *Crit Rev Microb* 2015 Jun 29:1-13.
- Lay MK, Gonzalez PA, Leon MA, Cespedes PF, Bueno SM, Riedel CA, et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2013 Mar;15(3):230-42.
- Sacks SH. Complement fragments C3a and C5a: the salt and pepper of the immune response. *Eur J Immunol* 2010 Mar;40(3):668-70.
- Bohmwald K, Espinoza JA, Becerra D, Rivera K, Lay MK, Bueno SM, et al. Inflammatory damage on respiratory and nervous systems due to hRSV infection. *Curr Opin Microbiol* 2015 May 27;36:14-21.
- Freitas GR, Silva DA, Yokosawa J, Paula NT, et al. Antibody response and avidity of respiratory syncytial virus-specific total IgG, IgG1, and IgG3 in young children. *J Med Immunol* 2011 Oct;83(10):1826-33.
- Singleton R, Etchart N, Hou S, Hyland L. Inability to evoke a long-lasting protective immune response to respiratory syncytial virus infection in mice correlates with ineffective nasal antibody responses. *J Virol* 2003 Nov;77(21):11303-11.
- Williams JV, Weitkamp JH, Blum DL, LaFleur BJ, Crowe JE, Jr. The human neonatal B cell response to respiratory syncytial virus uses a biased antibody variable gene repertoire that lacks somatic mutations. *Mol Immunol* 2009 Dec;47(2-3):407-14.
- Gonzalez PA, Bueno SM, Carreno LJ, et al. Respiratory syncytial virus infection and immunity. *Rev Med Virol* 2012 Jul;22(4):230-44.
- Cespedes PF, Bueno SM, Ramirez BA, et al. Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 Aug 5;111(31):E3214-23.
- Gonzalez PA, Prado CE, Leiva ED, Carreno LJ, Bueno SM, Riedel CA, et al. Respiratory syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Sep 30;105(39):14999-5004.
- Gerard A, Khan O, Beemiller P, Oswald E, Hu J, Matloubian M, et al.

- Secondary T cell-T cell synaptic interactions drive the differentiation of protective CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2013 Apr;14(4):356-63.
25. Morichi S, Kawashima H, Ioi H, Yamanaka G, Kashiwagi Y, Hoshika A, et al. Classification of acute encephalopathy in respiratory syncytial virus infection. *J Infect Chemother* 2011 Dec;17(6):776-81.
 26. Bohmwald K, Espinoza JA, Gonzalez PA, Bueno SM, Riedel CA, Kalergis AM. Central nervous system alterations caused by infection with the human respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2014 Nov;24(6):407-19.
 27. Espinoza JA, Bohmwald K, Cespedes PF, et al. Impaired learning resulting from respiratory syncytial virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 May 28;110(22):9112-7.
 28. Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg* 1957 Nov;66(3):291-300.
 29. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 1969 Apr;89(4):422-34.
 30. Polack FP, Teng MN, Collins PL, Prince GA, Exner M, Regele H, et al. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *J Exp Med* 2002 Sep 16;196(6):859-65.
 31. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Batalle JP, et al. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med* 2009 Jan;15(1):34-41.
 32. Knudson CJ, Hartwig SM, Meyerholz DK, Varga SM. RSV vaccine-enhanced disease is orchestrated by the combined actions of distinct CD4 T cell subsets. *PLoS pathogens* 2015 Mar;11(3):e1004757.
 33. American Academy of Pediatrics 1998 annual meeting. San Francisco, California, USA. October 16-21, 1998. Abstracts. *Pediatrics* 1998 Sep;102(3 Pt 2):671-878.
 34. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group. *Pediatrics* 1998 Sep;102(3 Pt 1):531-7.
 35. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious D, American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines C. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* 2014 Aug;134(2):415-20.
 36. Law BJ, Wang EE, MacDonald N, McDonald J, Dobson S, Boucher F, et al. Does ribavirin impact on the hospital course of children with respiratory syncytial virus (RSV) infection? An analysis using the pediatric investigators collaborative network on infections in Canada (PICNIC) RSV database. *Pediatrics* 1997 Mar;99(3):E7.
 37. Ventre K, Randolph A. WITHDRAWN: Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010(5):CD000181.
 38. Karron RA, Wright PF, Belshe RB, Thumar B, Casey R, Newman F, et al. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis* 2005 Apr 1;191(7):1093-104.
 39. Malkin E, Yogev R, Abughali N, Sliman J, Wang CK, Zuo F, et al. Safety and immunogenicity of a live attenuated RSV vaccine in healthy RSV-seronegative children 5 to 24 months of age. *PLoS one* 2013;8(10):e77104.
 40. Schickli JH, Kaur J, Tang RS. Nonclinical phenotypic and genotypic analyses of a Phase 1 pediatric respiratory syncytial virus vaccine candidate MEDI-559 (rA2cp248/404/1030DeltaSH) at permissive and non-permissive temperatures. *Virus Res* 2012 Oct;169(1):38-47.
 41. Raghunandan R, Lu H, Zhou B, Xabier MG, et al. An insect cell derived respiratory syncytial virus (RSV) F nanoparticle vaccine induces antigenic site II antibodies and protects against RSV challenge in cotton rats by active and passive immunization. *Vaccine* 2014 Nov 12;32(48):6485-92.
 42. Smith G, Raghunandan R, Wu Y, Liu Y, Massare M, Nathan M, et al. Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein expressed in insect cells form protein nanoparticles that induce protective immunity in cotton rats. *PLoS one* 2012;7(11):e50852.
 43. Garg R, Latimer L, Gerdtts V, Potter A, van Drunen Littel-van den Hurk S. Vaccination with the RSV fusion protein formulated with a combination adjuvant induces long-lasting protective immunity. *J Gen Virol* 2014 May;95(Pt 5):1043-54.
 44. Garg R, Latimer L, Simko E, Gerdtts V, Potter A, van den Hurk S. Induction of mucosal immunity and protection by intranasal immunization with a respiratory syncytial virus subunit vaccine formulation. *J Gen Virol* 2014 Feb;95(Pt 2):301-6.
 45. Lambert SL, Aslam S, Stillman E, MacPhail M, Nelson C, Ro B, et al. A novel respiratory syncytial virus (RSV) F subunit vaccine adjuvanted with GLA-SE elicits robust protective TH1-type humoral and cellular immunity in rodent models. *PLoS one* 2015;10(3):e0119509.
 46. Lee YN, Hwang HS, Kim MC, Lee YT, Cho MK, Kwon YM, et al. Recombinant influenza virus carrying the conserved domain of respiratory syncytial virus (RSV) G protein confers protection against RSV without inflammatory disease. *Virology* 2015 Feb;476:217-25.
 47. Lee S, Quan FS, Kwon Y, Sakamoto K, Kang SM, Compans RW, et al. Additive protection induced by mixed virus-like particles presenting respiratory syncytial virus fusion or attachment glycoproteins. *Antivir Res* 2014 Nov;111:129-35.
 48. McGinnes LW, Gravel KA, Finberg RW, Kurt-Jones EA, Massare MJ, Smith G, et al. Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins. *J Virol* 2011 Jan;85(1):366-77.
 49. Schmidt MR, McGinnes LW, Kenward SA, Willems KN, Woodland RT, Morrison TG. Long-term and memory immune responses in mice against Newcastle disease virus-like particles containing respiratory syncytial virus glycoprotein ectodomains. *J Virol* 2012 Nov;86(21):11654-62.
 50. Shafique M, Meijerhof T, Wilschut J, de Haan A. Evaluation of an intranasal virosomal vaccine against respiratory syncytial virus in mice: effect of TLR2 and NOD2 ligands on induction of systemic and mucosal immune responses. *PLoS one* 2013;8(4):e61287.
 51. Kamphuis T, Meijerhof T, Stegmann T, et al. Immunogenicity and protective capacity of a virosomal respiratory syncytial virus vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A in mice. *PLoS one* 2012;7(5):e36812.
 52. Bueno SM, Gonzalez PA, Cautivo KM, Mora JE, Leiva ED, Tobar HE, et al. Protective T cell immunity against respiratory syncytial virus is efficiently induced by recombinant BCG. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Dec 30;105(52):20822-7.
 53. Cautivo KM, Bueno SM, Cortes CM, Wozniak A, Riedel CA, Kalergis AM. Efficient lung recruitment of respiratory syncytial virus-specific Th1 cells induced by recombinant bacillus Calmette-Guerin promotes virus clearance and protects from infection. *J Immunol* 2010 Dec 15;185(12):7633-45.